EFECTO DE BLOQUEADORES ALFA Y BETA EN LA RESPUESTA HIDROSMOTICA DE LA PIEL AISLADA DEL SAPO **BUFO ARENARUM** A LA ADRENALINA, VASOPRESINA Y ANGIOSTENSINA II

SUSANA ARANDA DE ZAMUDIO (*) y ALFREDO COVIELLO (**)

(Cátedra de Introducción a la Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Cátedra de Fisiología, Facultad dt Medicina, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina).

SUMMARY

The hydrosmotic effect of epinephrine (E), vasopressin (VP) and angiotensin II (AT) were measured gravimetrically in untreated and phentolamine —or propranolol— treated toad skin. The existence of autoinhibition for high doses of E, previously reported to exist in frog skin, was confirmed in toad skin in the present series of experiments. Beta-adrenergic blocking agents significantly inhibit the hydrosmotic effect of submaximal doses of E, but it was found that, in contrast to previous reports, phentolamine also blocks such effects. No explanation exists as yet for this observation. Neither alpha-nor beta-blockers affect the response to VP or AT, showing that different receptors exist in toad skin for catecholamine and peptide hormones.

La piel del sapo, tejido que transporta activamente sodio y pasivamente agua, es sensible a diversos agentes hormonales como los polipéptidos neurohipofisiarios (vasopresina y ocitocina), catecolaminas (Jard, 1971) y angiotensina II (Coviello, 1972).

Existe evidencia sobre la existencia de receptores alfa y beta adrenérgicos en la piel de rana (Rajerison y col., 1972) individualizables por el uso de bloqueadores específicos: fentolamina y fenoxibenzamina para los alfa y propanolol para los beta. Según Kunos y Nickerson (1976), diversos factores como la temperatura posibilitarían la interconversión de estos receptores. Las diversas especies de anfibios presentan diferencias en los receptores alfa y beta (Watlington 1968, Jard 1971).

(*) Auxiliar Docente de Primera y (**) Miembro de la Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

El objeto del presente estudio fue demostrar su existencia en la piel aislada del sapo *Bufo arenarum* y obtener evidencia sobre el posible efecto de los bloqueadores alfa y beta en la respuesta hidrosmótica de la angiotensina II y vasopresina.

METODO

Se usaron sapos *Bufo arenarum* de ambos sexos mantenidos en agua corriente la noche previa a los experimentos, los que fueron realizados durante el verano a temperatura ambiente regulada a 24°C. Los animales fueron inmovilizados por destrucción medular y la piel ventral disecada.

Para la medición de la permeabilidad osmótica (Posm) se usó el método gravimétrico. Tres porciones de piel próxima fueran atadas al extremo de un tubo quedando la dermis hacia afuera. El interior del compartimiento así formado fue llenado con 1 ml de Ringer diluído 1/5 y la preparación sumergida en un baño de 10 ml de Ringer isotónico en el cual se hizo burbujear aire (Figura 1). Después de un período de equilibración de una hora en el cual ambos baños fueron cambiados dos veces se procedió a realizar un primer período de 20 minutos midiéndose en una de las preparaciones el efecto de un bloqueador adrenérgico y en las restantes la permeabilidad basal. En un segundo período de la misma duración, después de cambiar los baños, una preparación se mantuvo en Ringer como control (tubo 1), a otra se le cambió Ringer más la hormona (tubo 2) y a la tercera (tubo 3), sometida desde el período precedente a la acción del bloqueador, un nuevo baño con bloqueador más hormona. De esta manera se pudo disponer de un doble control en el período experimental y medir, en el primer período, el posible efecto del bloqueador sobre la permeabilidad basal.

Todas las drogas fueron agregadas al lado dérmico. Los resultados fueron expresados en $mg.cm^{-2}.h^{-1}$ como la media y su error standard, siendo la superficie de piel utilizada 1,54 cm^2. El efecto medio de la hormona con (tubo 3) y sin inhibidor (tubo 2) fue obtenido de la doble diferencia entre el período experimental y su control y la variación espontánea de la permeabilidad registrada en el restante (tubo 1). La significación estadística de los efectos medios y sus diferencias fue obtenida mediante un test de "t" para muestras pareadas.

La solución de ringer contenía ClNa 90mM, CO_3HNa 25 mM, ClK 3 mM, $ClCa_2$ 1 mM, SO_4Mg 0,5 mM y PO_4H_2K 0,5 mM. El pH fue ajustado a 7,4 y la presión osmótica a 220 mOsm/kg.

DROGAS

Se usó angiotensina II (5–Val–Hypertensin–1–amide CIBA), vasopresina (Pitressin PARKE DAVIS), adrenalina (MERCK) y como bloqueador alfa adrenérgico clorhidrato de fentolamina (Regitina CIBA) mientras que como bloqueador beta se usó propanolol (Noloten BETA).

RESULTADOS

En la figura 2 se muestra una curva dosis–respuesta a la adrenalina realizada durante el verano. Las dosis mínimas se encuentran entre 10^{-9} y 10^{-8} M siendo la diferencia entre esta última y la de 10^{-7} M estadísticamente significativa. A partir de 10^{-7} M una dosis superior produce un efecto menor, llamado por Jard (1971) autoinhibición y descripto en la piel de rana (Bastide y Jard 1968). En la figura 3 se observa que el bloqueador alfa (fentolamina) reduce significativamente (65 %) en dosis equimolares (10^{-5} M) la respuesta a una dosis supramáxima de adrenalina. En la misma figura puede observarse que esta dosis de fentolamina no afecta la respuesta a una dosis de angiotensina II 50 veces menor ni a otra 500 veces menor de vasopresina.

Esta inhibición obtenida con el bloqueador alfa con dosis supremáximas de adrenalina difiere de los datos de Bastide y Jard (1968) y Rajerison y col. (1972) por lo cual se procedió a realizar experimentos con el bloqueador beta, propanolol. La figura 4 muestra que el propanolol en dosis de 10^{-5} M, sin efecto *per se* sobre la permeabilidad basal, anula el efecto de una dosis equimolar de adrenalina (supramáxima), mientras que no afecta a la angiotensina II y la vasopresina en dosis 200 y 2000 veces mayores respectivamente.

DISCUSION

Los presentes experimentos muestran una acción inhibitoria de ambos bloqueadores (alfa y beta) sobre la respuesta hidrosmótica a la adrenalina resultado en sí contradictorio y en oposición a los encontrados —entre otros— por Rajerison y col. (1972), para quienes la catecolaminas tienen una acción estimulante (receptores beta) y otra inhibitoria (receptores alfa) sobre la enzima adenilatociclasa, mediadora de los efectos sobre la permeabilidad.

En otras preparaciones (útero, oviductos de rata y conejillos de la India), la fentolamina podría producir efectos secundarios debido a la liberación de las prostaglandinas (M. Gimeno y col. 1974). Como en la piel del sapo la prostaglandina E_1 inhibe la adenilatociclasa, la acción bloqueadora sobre el efecto alfa de la adrenalina quedaría enmascarada. Sin embargo, esta acción secundaria de la fentolamina debería bloquear también la respuesta a la vasopresina y a la angiotensina II ya que el efecto hidrosmótico de estas hormonas en piel es inhibido por la PGE_1 (Coviello y col. 1975).

Los presentes resultados muestran el efecto de autoinhibición de dosis supramáximas de adrenalina sobre la permeabilidad osmótica de piel de sapo y una acción inhibitoria común de los bloqueadores alfa y beta sobre la respuesta hidrosmótica de esta hormona, sin explicación en base a los presentes resultados. Los bloqueadores carecen de acción sobre la Angiotensina II y vasopresina, demostrando al menos que existen receptores diferentes para las hormonas neurohipofisiarias y para las catecolaminas.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue realizado con subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (6036b/75) y de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la República Argentina. La angiotensina II (Hypertensin CIBA) fue donada por los Dres. P. Desaulles y K. Scheibli (Basel, Suiza), lo mismo que la fentolamina (Regitina CIBA). La vasopresina fue gentilmente facilitada por el Dr. F. C. Armstrong de PARKE DAVIS, Estados Unidos.

BIBLIOGRAFIA

1. BASTIDE, F. et JARD, S., 1968. Actions de la noradrénaline et de l'ocytocine sur le transport actif de sodium et la permeabilité à l'eau de la peau de grenouille. Rôle du 3', 5'—AMP cyclique. Biochim. biophys. Acta, *150:* 113-123, 1968.
2. COVIELLO, A., 1972. Efecto de la angiotensina II en el metabolismo del sodio y del agua en membranas de anfibios. Tesis del doctorado, Universidad Nacional de Tucumán.
3. COVIELLO, A., BRAUCKMANN, E. S., ATENOR, M. S. B. DE, APUD, J. A. and CAUSARANO, J., 1975. Hydrosmotic effect of angiotensin II in toad skin: role of cyclic AMP. Acta physiol. latinoam. *25:* 379-386.
4. GIMENO, M. F., RETTORI, V., BORDA, E., BORDA, L. S., DE and GIMENO, A. L., 1974. Stimulating influence of adrenergic biocking agents on the motility of uterus, oviducts, mesosalpinx and ovaries of different mammals. Com. Libres, Acta Physiol. latinoam. *24:* 84-85, 1974.
5. JARDS, S., 1971. The mode of action of ADH. J. Physiol., (Paris), *63:* 99-146.
6. KUNOS, G. and NICKERSON, M., 1976. Temperature-induced interconversion of α-and β-adrenoceptors in the frog heart. J. Physiol. (London), *256:* 23-40.
7. RAJERISON, R. M., MONTEHUT, M., JARD, S. and MOREL, F., 1972. The isolated frog skin epithelium: presence of α-and β-adrenergic receptors regulating active sodium transport and water permeability. Pflügers Archiv. *332:* 313-331.
8. WATLINGTON, CH. O. 1969. α-adrenergic inhibition of Na+ transport: the interaction of vasopressin and 3' 5' - AMP. Biochim. biophys. Acta, *193:* 394-402.

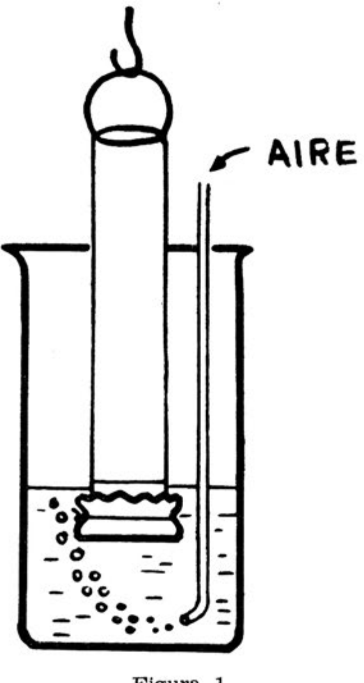


Figura 1

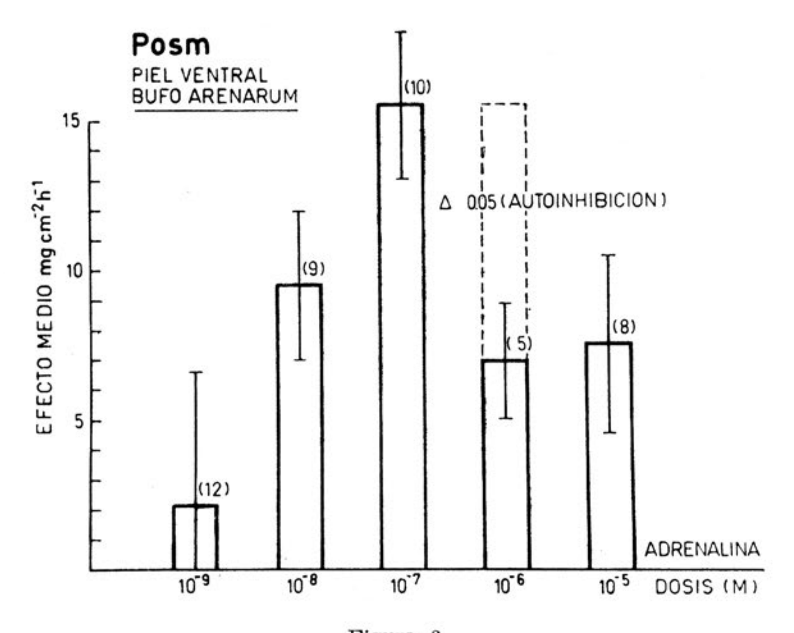


Figura 2

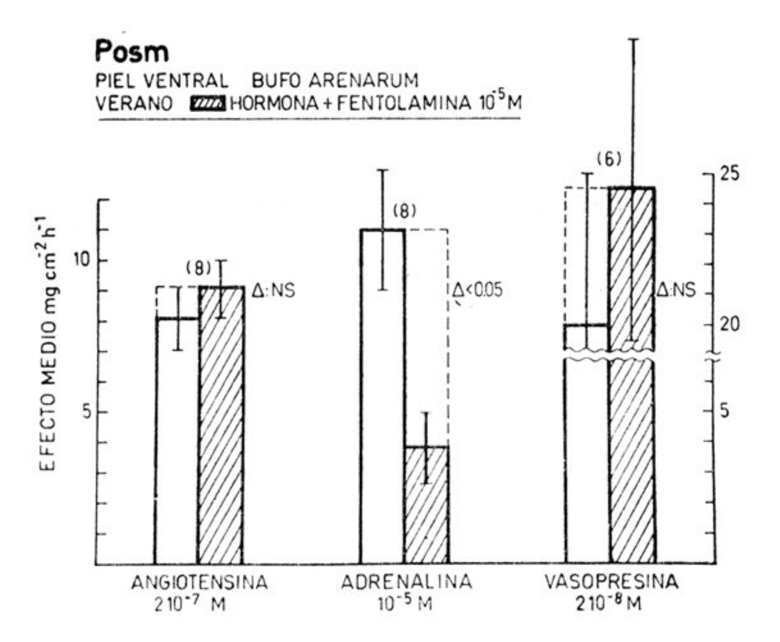


Figura 3

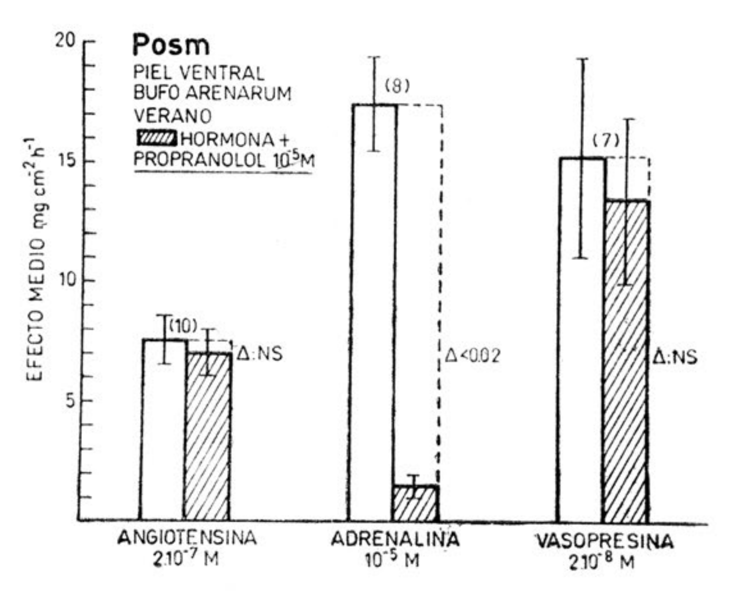


Figura 4